

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-69309

(P2004-69309A)

(43) 公開日 平成16年3月4日(2004.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 27/30	GO 1 N 27/30 F	2 G O 4 5
C 1 2 M 1/34	C 1 2 M 1/34 B	4 B O 2 9
GO 1 N 27/416	GO 1 N 33/483 F	
GO 1 N 33/483	GO 1 N 27/46 3 4 1 Z	
// GO 1 N 33/15	GO 1 N 33/15 Z	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 16 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-224563 (P2002-224563)
 (22) 出願日 平成14年8月1日(2002.8.1)

(71) 出願人 000005821
 松下電器産業株式会社
 大阪府門真市大字門真1006番地
 (74) 代理人 100097445
 弁理士 岩橋 文雄
 (74) 代理人 100103355
 弁理士 坂口 智康
 (74) 代理人 100109667
 弁理士 内藤 浩樹
 (72) 発明者 中谷 将也
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下
 電器産業株式会社内
 (72) 発明者 岡 弘章
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下
 電器産業株式会社内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法

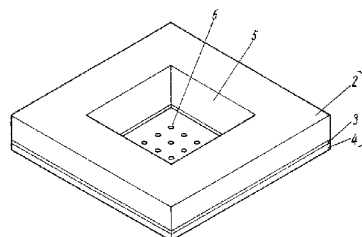
(57) 【要約】

【課題】 細胞外電位測定デバイスにおいて複数のウエルを基板内に高密度に配置する必要があるときに、被験体細胞を保持する窪みのウエル側の開口部の大きさと貫通口側の大きさを二段階にする必要があり、この形状を正確に実現する方法が期待されていた。

【解決手段】 基板1がベース2と、このベース2とは異なる材料による中間層3と、ベースとほぼ同じ材料による薄板4の積層構造からなり、前記ベース2内に少なくとも一つ以上のウエル5と、前記薄板4内に前記ウエル5と基板1の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口6を設ける。

【選択図】 図1

1 基板
 2 ベース
 3 中間層
 4 薄板
 5 ウエル
 6 貫通口



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイス。

【請求項 2】

貫通口のウエル側に窪みを有するとともに、この窪みの開口部を貫通口の開口部より大きくした請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

10

【請求項 3】

窪みの内壁を円錐形とした請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 4】

窪みの内壁を半球形とした請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 5】

中間層の電気抵抗率を薄板の電気抵抗率よりも高くした請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 6】

中間層と薄板を構成する材料を同じエッチングガスに対するエッチングレートの比が異なる材料で構成した請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

20

【請求項 7】

ベース及び薄板がシリコンからなり、中間層が二酸化シリコンからなる請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 8】

窪みの開口部が $10 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、貫通口の開口部が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ である請求項 2 に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項 9】

基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、ベースにエッチングによって前記ウエルを設ける工程と、薄板に 1 種類のマスクを用いたドライエッチングによって前記貫通口を設ける工程と、ウエルの底部の中間層をドライエッチングによって除去する工程と、外方側より薄膜技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法。

30

【請求項 10】

薄板に 1 種類のマスクを用いたドライエッチングによって貫通口を設ける工程において、外方側よりドライエッチングによって形成されるとともに、このドライエッチングは少なくともエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いて行う請求項 9 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

40

【請求項 11】

貫通口を形成する際のドライエッチングにおいて、エッチングを抑制するガスを用いる工程とエッチングを促進するガスを用いる工程とを交互に繰り返して行う請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 12】

貫通口を設ける工程において、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスによるドライエッチングの比率がエッチングが進むに従って高くなるようにエッチングする請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 13】

貫通口を設ける工程において、エッチングを促進する工程とエッチングを抑制する工程を

50

繰り返して行うドライエッチングは二酸化珪素からなる中間層に達する前に止め、次にエッチングを促進するガスのみで二酸化珪素による中間層に達するまでドライエッチングを行う請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 14】

エッチングを促進するガスを用いる工程とエッチングを抑制するガスを用いる工程において、前記ガスを分解するための手段としてコイルによる誘導結合法を用い、ドライエッチングを促進する工程の際には基板に高周波をかけて行い、ドライエッチングを抑制する工程の際には基板に高周波をかけないで行う請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 15】

貫通口を形成する工程において、ドライエッチングを促進する工程とドライエッチングを抑制する工程を繰り返して行い、二酸化珪素を主体とする中間層にドライエッチングが達した後も過剰に薄板をドライエッチングする請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 16】

ベースと薄板がシリコンよりなり、中間層が二酸化珪素よりなる細胞外測定デバイスの製造方法であって、下部層に貫通口を形成する際に使用するガスとして、エッチングを促進するガスが SF_6 、 CF_4 、 XeF_2 のうちいずれか一つを含むガスであり、エッチングを抑制するガスが C_4F_8 、 CHF_3 のいずれかまたはこれらを含むガスを用いる請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は細胞外電位あるいは細胞の活動に発生する物理化学的変化を測定するために用いられる細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法であり、例えば化学物質によって細胞が発する反応を検出する薬品スクリーニングに用いられる。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の電気的活動を指標にして薬品をスクリーニングすることはパッチクランプ法、蛍光色素または発光指示薬を用いる方法により行われている。

【0003】

このパッチクランプ法はマイクロピペットの先端部分に付けた細胞膜の微小部分（パッチと呼ぶ）を用いて、単一のタンパク質分子を介するイオンの輸送を微小電極プローブによって電氣的に記録する方法であり、この方法は一個のタンパク質分子の機能をリアルタイムで調べることのできる数少ない方法の一つである（たとえば、細胞の分子生物学、第三版、Garland Publishing Inc.、New York、1994、日本語版、中村桂子ら監訳、181～182頁、1995年、教育社参照）。

【0004】

また、特定のイオンの濃度変化に応じて光を発する蛍光色素または発光指示薬により、細胞内のイオンの移動をモニタすることで細胞の電気的活動を測定する方法もある。

【0005】

しかし、パッチクランプ法ではマイクロピペットの作成及び操作に特殊な技術を必要とし、一つの試料の測定に多くの時間を要するため大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする用途には適していない。また、蛍光色素などを利用する方法は大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングできるが、細胞を染色する工程が必要で測定においては色素の影響によるバックグラウンドが高い上に時間とともに脱色するため S/N 比が悪いという欠点がある。

【0006】

これに代わる方法として、既に特願 2001-001980 号および特願 2001-170341 号により開示される方法は、パッチクランプ法で得られるデータと同等の高品質

10

20

30

40

50

なデータが得られ、しかも蛍光色素を用いる方法のように簡易に高速で大量の試料を測定できるものである。これらの先行技術では、基板上に設けられた細胞の保持手段を有する少なくとも一つのウェルと、このウェルに電気信号を検出するセンサー手段とを有する細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する、いわゆる細胞外電位測定デバイスについて開示されている。今少し、上記先行技術で開示される細胞外電位測定デバイスの動作について図面を用いて説明する。

【0007】

図20は上記先行技術で開示される細胞外電位測定デバイスのウェル構造を模式断面図で示したものであり、ウェル40内に培養液48が入れられ、被験体細胞47は基板42に設けられた細胞保持手段によって捕捉または保持されている。細胞保持手段は基板42に形成された窪み41および開口部を介して、この窪み41に連絡する貫通口44を備えている。さらに、貫通口44の中にはセンサー手段である測定電極45が配置されており、この測定電極45は配線を経て信号検出部に連結されている。

10

【0008】

測定の際には、被験体細胞47を貫通口44側から吸引ポンプなどの手段によりこの被験体細胞47が窪み41部分に密着保持される。このようにして被験体細胞47の活動により発生する電気信号はウェル40中の培養液48側に漏れることなく、貫通口44側に設けた測定電極45によって検出される。

【0009】

ここで、窪み41部に被験体細胞47を保持させるためには窪み41の上部に被験体細胞47、培養液48およびこれと反応する薬剤を混合させるための容器であるウェル40が必要である。従来例では、ウェル40は基板42とは別に設けられ、図20のように窪み41の上部にセットされていた。

20

【0010】

さらに、被験体細胞47を保持する窪み41部の大きさは10～30 μ m程度であり、貫通口44側の大きさが1～5 μ mと2段階になっている上、貫通口44の長さは、通常10 μ m程度にする必要がある。この形状を正確に実現するためには、2種類のマスクを用いて、まず、第一のマスクによって窪み41のドライエッチングを行った後、第二のマスクによって貫通口44のドライエッチングを行う必要がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記のような細胞外電位測定デバイスにおいて特に問題となるのはウェル40と貫通口44と窪み41の形成された基板42とを別々に設けると、ウェル40と基板42の貼り合わせが必要であるとともに正確な位置合わせも必要である。特に複数のウェル40を基板42内に高密度に配置する必要がある場合には、位置合わせに加えて液体が漏れ出さないように確実に貼り合わせる必要があり、その作業は困難なものとなる。

30

【0012】

さらに、上述のように2種類のマスクを用いて行くと第一のマスクによるドライエッチングを行った後、第二のマスクを用いてドライエッチングを行う際にマスクのアライメントずれが生じるという課題が発生する。

40

【0013】

又、2枚のマスクを用意して、それぞれ別々にフォトリソグラフィを行うので製造的にも手間がかかり、コスト高を招くことがある。

【0014】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項1に記載の発明は、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウェルと、前記薄板内に前記ウェルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスであ

50

り、ベース内にウエルが設けられているので、別途ウエルを設ける必要がなく、基板の中にウエル、貫通口が一体化されている極めてコンパクトな細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0015】

本発明の請求項2に記載の発明は、貫通口のウエル側に窪みを有するとともに、この窪みの開口部を貫通口の開口部より大きくした請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、被験体細胞は貫通口側に引き込まれるとともに、窪み内に確実に保持することができる。

【0016】

本発明の請求項3に記載の発明は、窪みの内壁を円錐形とした請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、円錐形とすることにより、ウエル側から被験体細胞が容易に進入することが可能であり、かつ円錐形内には一つの被験体細胞しか進入できないので、被験体細胞の保持がより確実にできる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0017】

本発明の請求項4に記載の発明は、窪みの内壁を半球形とした請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、一つの被験体細胞が進入可能なことに加えて、貫通口との接続面が半球形であるので、この貫通口との接続面に被験体細胞の表面がより確実に接することとなり、被験体細胞の保持を確実にすることができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0018】

本発明の請求項5に記載の発明は、中間層の電気抵抗率を薄板の電気抵抗率よりも高くした請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、貫通口および窪みを薄板側からドライエッチングによって形成する際に、エッチングイオンが電気抵抗率の大きい中間層に蓄積することにより、エッチングイオンが中間層の近辺の薄板部分をもドライエッチングするようになるので貫通口のドライエッチング時に同時に窪みを形成できるという製造上の利点を有する細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0019】

本発明の請求項6に記載の発明は、中間層と薄板を構成する材料を同じエッチングガスに対するエッチングレートの比が異なる材料で構成した請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、薄板に貫通口と窪みをドライエッチングによって形成する際に、エッチングが中間層に達した後も中間層をドライエッチングしてしまわないようにできるので、より高精度な貫通口および窪みの形成を実現できるという製造上の利点を有する細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0020】

本発明の請求項7に記載の発明は、ベース及び薄板がシリコンからなり、中間層が二酸化シリコンからなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、シリコンと二酸化シリコンは同じドライエッチングガス、例えば SF_6 、 CF_4 、 XeF_2 に対して大きなエッチングレートの差を持つことから、薄板に貫通口および窪みを高精度に形成できるという請求項6に記載の発明の効果を補完するものである。

【0021】

本発明の請求項8に記載の発明は、窪みの開口部が $10 \sim 100 \mu\text{m}$ であり、貫通口の開口部が $1 \sim 10 \mu\text{m}$ である請求項2に記載の細胞外電位測定デバイスであり、例えば被験体細胞の大きさが $10 \mu\text{m}$ である場合に、窪みの開口部の大きさを $15 \mu\text{m}$ 、貫通口の大きさを $5 \mu\text{m}$ とすれば、被験体細胞は窪み内に一つしか進入できず、かつ貫通口を通り抜けることはできないので、確実に窪みに保持される細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0022】

本発明の請求項9に記載の発明は、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースとほぼ同じ材料による薄板の積層構造からなり、前記ベース内に被験体細胞及び培養液及び薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つ以上のウエルと、前記薄板内に前記ウエ

10

20

30

40

50

ルと基板の外方に通じる少なくとも一つ以上の貫通口が設けられた細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法であって、ベースにエッチングによって前記ウェルを設ける工程と、薄板に１種類のマスクを用いたドライエッチングによって前記貫通口を設ける工程と、ウェルの底部の中間層をドライエッチングによって除去する工程と、外方側より薄膜技術により検出電極を形成する工程を含む細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、薄板に貫通口を形成する際に貫通口のウェル側に貫通口の大きさより広い窪みを１種類のマスクを用いるだけで容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【００２３】

本発明の請求項１０に記載の発明は、薄板に１種類のマスクを用いたドライエッチングによって貫通口を設ける工程において、外方側よりドライエッチングによって形成されるとともに、このドライエッチングは少なくともエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの２種類を用いて行う請求項９に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスを用いると、ドライエッチングの抑制と促進の割合を制御しながらドライエッチングできるので、貫通口の穴サイズが少なくとも外方側においてマスクと同じ大きさになるように垂直にドライエッチングすることが可能になる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

10

【００２４】

本発明の請求項１１に記載の発明は、貫通口を形成する際のドライエッチングにおいて、エッチングを抑制するガスを用いる工程とエッチングを促進するガスを用いる工程とを交互に繰り返して行う請求項１０に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の穴形状がより垂直にドライエッチングできるようになるという請求項１０に記載の発明の効果を補完するものである。

20

【００２５】

本発明の請求項１２に記載の発明は、貫通口を設ける工程において、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスによるエッチングの比率がエッチングが進むに従って高くなるようにエッチングする請求項１０に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の形成工程が進むにつれてドライエッチングを促進するガスの割合が増えると、貫通口のウェル側のエッチング径が広がり、ウェル側に窪みが容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

30

【００２６】

本発明の請求項１３に記載の発明は、貫通口を設ける工程において、ドライエッチングを促進する工程とドライエッチングを抑制する工程を繰り返して行うドライエッチングは二酸化珪素からなる中間層に達する前に止め、次にエッチングを促進するガスのみで二酸化珪素による中間層に達するまでドライエッチングを行う請求項１０に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、中間層に達する前にドライエッチング条件を変えるので、貫通口と窪みを連続的に容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【００２７】

本発明の請求項１４に記載の発明は、ドライエッチングを促進するガスを用いる工程とエッチングを抑制するガスを用いる工程において、前記ガスを分解するための手段としてコイルによる誘導結合法を用い、ドライエッチングを促進する工程の際には基板に高周波をかけて行い、ドライエッチングを抑制する工程の際には基板に高周波をかけないで行う請求項１０に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、ドライエッチングを促進する時に基板に高周波を印加するとともにエッチングを抑制する時には印加しないので均一な保護膜の形成が可能となる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

40

【００２８】

本発明の請求項１５に記載の発明は、貫通口を形成する工程において、ドライエッチングを促進する工程とドライエッチングを抑制する工程を繰り返して行い、二酸化珪素を主体

50

とする中間層にドライエッチングが達した後も過剰に薄板をドライエッチングする請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、中間層に達した後も過剰にドライエッチングを行うことでエッチングイオンを中間層の表面に蓄積させることができ、このためドライエッチングは中間層付近ではエッチングが横方向に広がるようになる。そのために貫通口の形成と同時にウエル側に窪みを容易に形成できる細胞外電位測定デバイスの製造方法を実現することができる。

【0029】

本発明の請求項 16 に記載の発明は、ベースと薄板がシリコンよりなり、中間層が二酸化珪素よりなる細胞外測定デバイスの製造方法であって、下部層に貫通口を形成する際に使用するガスとして、エッチングを促進するガスが SF_6 、 CF_4 、 XeF_2 のうちいずれか一つを含むガスであり、エッチングを抑制するガスが C_4F_8 、 CHF_3 のうちいずれか一つを含むガスを用いる請求項 10 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、貫通口の外方側はマスクと同じ大きさの垂直なドライエッチング形状であり、ウエル側はこれよりも広い窪みとすることができる請求項 10～15 に記載の発明の効果を補完するものである。

【0030】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法について実施の形態および図面を用いて説明する。

【0031】

（実施の形態 1）

本発明の実施の形態 1 及び図 1～図 13 により請求項 1～3、6～12、14 及び 16 に記載の発明について説明する。

【0032】

図 1 は本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの一実施の形態を示す斜視図であり、図 2 及び図 3 はその断面図である。また図 4～図 5 は同要部の拡大断面図である。更に図 6～図 13 は細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図である。

【0033】

図 1～図 3 において、基板 1 はシリコンからなるベース 2、二酸化珪素からなる中間層 3 及びシリコンからなる薄板 4 の積層構造で構成されている。このベース 2 には被験体細胞を含むサンプル溶液を貯め、被験体細胞 10 とこれの培養液 11 と薬剤を混ぜ合わせるためのウエル 5 が設けられており、さらにウエル 5 の底部の薄板 4 には貫通口 6 が設けられている。この貫通口 6 のウエル 5 側に窪み 7 が設けられており、ウエル 5 側の開口部の大きさが基板 1 の下面の開口部より大きい形状に加工してある。

【0034】

なお、貫通口 6、窪み 7 の大きさは被験体細胞 10 の大きさ・性質によって決めることができる。例えば被験体細胞 10 の大きさが $10\text{ }\mu\text{m}$ であれば、窪み 7 の大きさは $10\text{ }\mu\text{m}$ 以上、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 以下とし、貫通口 6 の大きさは $5\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。

【0035】

また、本実施の形態 1 においては窪み 7 の内壁部はウエル 5 側を底面とする円錐形をしている。

【0036】

次に、少なくともウエル 5 の内壁および底面、貫通口 6 の内壁および窪み 7 の内壁、薄板 4 の下面にはシリコンの上に二酸化シリコンによる絶縁体 9 が設けられており、さらに貫通口 6 の内壁、薄板 4 の外方側には上記絶縁体 9 の上に金を主体とする検出電極 8 が設けられている。

【0037】

又、一般的に細胞の大きさは $5\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ であるので窪み 7 の開口部は $10\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ とし、貫通口 6 の開口部は $1\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ の範囲とすることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0038】

上記のような構成を有する細胞外電位測定デバイスは次のような動作によって細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定することができる。この動作について図面を用いて説明する。

【0039】

図3は細胞外電位測定デバイスに被験体細胞10と培養液11をウェル5内に投入したときの様子を断面図で示しており、図4～図5は貫通口6および窪み7の部分の要部拡大断面図である。

【0040】

図3に示すように、ウェル5内に培養液11と被験体細胞10を入れると、しばらく被験体細胞10は培養液11中に浮遊している。また培養液11は液体であるのでウェル5内だけでなく窪み7、貫通口6を満たした後、ウェル5の下面側にも流れ出す。このようにすると、浮遊している被験体細胞10はウェル5内の圧力によつて、図4に示すように窪み7へ引き込まれる。引き込みの圧力が足りない場合には貫通口6側から吸引ポンプなどの手段により吸引すると浮遊している被験体細胞10はより確実に窪み7側に吸引することができる。

10

【0041】

次に、窪み7へ到達した被験体細胞10は貫通口6側からの吸引あるいはウェル5側からの培養液11によって圧力を受けていることから、図4のように窪み7に保持される。このような状態でウェル5内の培養液11に薬剤（図示せず）を投与すれば、薬剤は培養液11内に浸透し、図5に示すように被験体細胞10が薬剤とイオンの交換による反応が発生して活性化された場合に、貫通口6内で発生した電気信号は貫通口6に満たされている培養液11の電位を変化させることになる。この電位の変化は培養液11に接している検出電極8によって外部に取り出される。

20

【0042】

このように、本発明の細胞外電位測定デバイスではウェル5の底面に窪み7が設けてあるので、従来のように別途ウェルを設ける必要がなく、ウェル5内に被験体細胞10と培養液11および薬剤を直接混合させることができる。また、ウェル5と底面に設けられた窪み7および貫通口6は一体化されているので、培養液11が不用意にウェル5外に漏れ出すこともなく確実に貫通口6側へ流れることができる。

30

【0043】

さらに、窪み7の内壁、貫通口6の内壁、薄板4の下面、ウェル5の底面および内壁には二酸化シリコンからなる絶縁体9が設けられているので、検出電極8はウェル5側とは電氣的に絶縁されている。さらに、窪み7の内壁はウェル5側を底面とする円錐形をしているので、被験体細胞10が貫通口6側に滞ることなく引き込まれて安定に保持することができる。一例として被験体細胞10の大きさが $10\mu\text{m}$ である場合において、窪み7のウェル側の大きさ、つまり円錐形の底面の大きさは $20\mu\text{m}$ 以下とすることにより、2つ以上の被験体細胞10が同時に窪み7の中に進入することがなくなり、貫通口6の大きさは $5\mu\text{m}$ 以下とすることにより、被験体細胞10が貫通口6を通り抜けることはない。

【0044】

このように、測定の際には被験体細胞10は窪み7に確実に保持されている状態を実現することができる。つまり、貫通口6側の培養液11と、ウェル5側の培養液11とは電氣的に絶縁された状態にあるので、被験体細胞10の活動により発生する電気信号はウェル5側の培養液11に漏れることなく、貫通口6側に設けた検出電極8によって検出することができる。なお、上記絶縁層9はシリコンの表層の表面抵抗率が低いときに貫通口6付近で発生する信号が微小であり、わずかでもウェル5側にリークすると測定できなくなってしまう場合においてのみ必要となってくる。

40

【0045】

従って、シリコン自体の表面抵抗率が十分高ければ被験体細胞10が保持されるだけで十分電氣的な絶縁性の実現されるので、わずかなリークが問題ない程度に細胞外電位が大き

50

いのであれば絶縁体 9 は必ずしも必要ではない。

【0046】

次に本発明の細胞外電位測定デバイスの製造方法について図 6 ～図 13 を用いて説明する。

【0047】

上記細胞外電位測定デバイスの製造方法は図 6 に示すようにシリコンからなるベース 2 と、二酸化シリコンからなる中間層 3 と、シリコンからなる薄板 4 で構成される基板 1 を用意し、薄板 4 側にレジストマスク 12 を形成する。なお、上記のような基板 1 は一般に SOI 基板と呼ばれ、半導体デバイスを作製する際に良く用いられ、入手は容易であるのでこの基板の製造方法については省略する。

10

【0048】

次に、ドライエッチングによって貫通口 6 を薄板 4 の所定のエッチング深さに達するまで形成する。図 7 は図 6 の A 部の要部拡大図を示している。このときのエッチング法はドライエッチングによる方法が最適であり、ドライエッチングの際にはエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを用いることが重要である。

【0049】

このエッチングを促進するガスには SF_6 、 CF_4 、 XeF_2 などを用いることができるが、これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけでなく、横方向へのエッチングも促進する作用がある。

【0050】

そこで CHF_3 、 C_4F_8 、 XeF_2 などのエッチングを抑制するガスを混合させておくことで、ドライエッチングされた壁面に CF_2 のポリマーである保護膜を作製することにより、図 7 に示すようにドライエッチングによる貫通口 6 の形成をレジストマスク 12 の下方のみに進行させることが可能となる。

20

【0051】

また、エッチング形状を垂直にする別の方法として、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッチング形状とすることができる。

【0052】

実験では、大きさ $5\text{ }\mu\text{m}$ の貫通口 6 を形成するために SF_6 を 130 sccm 流しながら 13 秒間プラズマ発生させることで約 $1\text{ }\mu\text{m}$ のドライエッチングを行い、その後 C_4F_8 を 85 sccm 流しながら 7 秒間プラズマ発生させて約 $0.01\text{ }\mu\text{m}$ の保護膜を形成し、またドライエッチングを行うという作業を 6 回繰り返した結果、約 $7\text{ }\mu\text{m}$ の深さのほぼ垂直なエッチング形状とすることができた。なお、エッチングを抑制するガスによって保護膜は貫通口 6 の壁面だけでなく底面にも形成されるが、底面に形成された保護膜は壁面に形成された保護膜に比べてエッチングを促進するガスによって容易に除去することができるので、エッチングは下方のみに進むことが可能となる。

30

【0053】

さらにエッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、外部コイルによる誘導結合法による高周波を基板 1 に加えることで基板 1 にマイナスのバイアス電圧が発生することにより、プラズマ中のプラスイオンである SF_5^+ や CF_3^+ が基板 1 に向かって衝突するのでドライエッチングはより垂直な方向に進むことになる。

40

【0054】

また、ドライエッチングを抑制させる際には基板 1 に高周波を加えなければ基板 1 にはバイアス電圧が全く発生しないので、保護膜の材料となる CF^+ が偏向を受けなくなり、基板 1 のドライエッチング穴の壁面へ均一な保護膜の形成ができることになる。

【0055】

さらに図 8 に示すように、ドライエッチングによって中間層 3 に達するまでドライエッチングを行うが、本工程において重要なことは薄板 4 側からドライエッチングを行って掘り進めていく際に、エッチングが進むにつれてエッチングを促進するガスの割合を徐々に増

50

やしていく、あるいはエッチングを促進するガスによるエッチング時間を徐々に増やすことである。つまり、ドライエッチングが促進される工程とドライエッチングが抑制される工程が繰り返される過程において、ドライエッチングが促進される工程の割合をドライエッチングが進むにつれて徐々に増やすのである。

【0056】

これによりエッチングの形状は図8に示すようにウエル5側が広くなるようにテーパ形状が設けられるようになり、貫通口6は薄板4の下面側の開口部よりウエル5側の開口部の方が大きくなるように形成することができる。

【0057】

このドライエッチングの工程において、中間層3として二酸化シリコンが設けてあるので、貫通口6のドライエッチングが完了して中間層3に達したときに、ドライエッチングをすぐに止めなくても支障は発生しない。それはエッチングガスがすぐには中間層3をエッチングすることはないからである。

10

【0058】

特に、エッチングを促進するガスに SF_6 を用いた場合には、このエッチングガスはシリコンと二酸化シリコンのエッチングレート比が10以上であるので、貫通口6のドライエッチングが二酸化シリコンまで到達した後しばらくエッチングしても、二酸化シリコンの中間層3を簡単には除去しないので高寸法精度の窪み7を容易に形成することができる。

【0059】

次に、図9に示すようにベース2側にフォトリソグラフィによってレジストマスク13を形成した後、図10に示すようにエッチングによって中間層3に達するまでベース2をエッチングし、ウエル5を形成する。このときのエッチング方法としては前述のようなエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを用いたドライエッチングがウエル5を高密度に配置するためには有利であるが、それほど高密度に配置する必要がないのであればTMAHやKOHを用いたウェットエッチングでも可能である。

20

【0060】

次に図11に示すように、ウエル5の底面に露出した二酸化シリコンの中間層3をエッチングによって除去する。このときの方法はHFによるウェットエッチングの他、 CF_4 ガスによるドライエッチングなどが利用できる。

30

【0061】

その後、図12に示すように、レジストマスク13を除去した後に、熱酸化法によってベース2及び薄板4を構成しているシリコンの表面に二酸化シリコンを形成する。これによって、少なくともウエル5の内壁および底面、窪み7の内壁、貫通口6の内壁、薄板4の下面に二酸化シリコンによる絶縁層9が形成される。

【0062】

次に、図13に示すように、薄板4の下面側から金を蒸着やスパッタにより検出電極8を形成する。これにより、検出電極8は薄板4の下面だけではなく、貫通口6の内壁にも形成される。なお、この検出電極8の材料は培養液11と反応しない電極材料であれば使用することができるが、特に金、白金、銀、塩化銀、アルミニウムなどを用いることがより好ましい。どの電極材料を設けるかはサンプル溶液の種類によって適当な材料が選ばれるべきである。

40

【0063】

このように、本発明の製造方法を用いることにより、薄板4に形成する貫通口6が円錐形の窪み7をウエル5側に連結された状態で1枚のフォトマスクと薄板4側からの一度のエッチングだけで細胞外電位測定デバイスを容易に且つ高精度に形成することができる。

【0064】

(実施の形態2)

本発明の実施の形態2及び図14～図16により請求項4、13に記載の発明を説明する。図14は本発明の実施の形態2における細胞外電位測定デバイスの構成とその製造方法

50

を説明するための断面図であり、図 1 5 及び図 1 6 はその要部拡大断面図である。

【0065】

次に、実施の形態 2 における細胞外電位測定デバイスの構成とその製造方法について説明する。実施の形態 2 で開示される発明は実施の形態 1 で開示される細胞外電位測定デバイスと基本的な構成は同じであり、同じ構成についての説明は省略し、異なる構成についてのみ説明する。

【0066】

図 1 4 は本実施の形態 2 における細胞外電位測定デバイスの断面図であり、薄板 1 8 に形成された窪み 2 1 の形状が図 1 4 に示すように半球形をしている点で異なっている。窪み 2 1 をこのような半球形の形状とすることにより、被験体細胞 1 0 はより密着して窪み 2 1 へ保持することができることから貫通口 2 0 の培養液 1 1 の電位変化をより捉えやすくすることが可能となるものである。

10

【0067】

次に、この細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明する。

【0068】

本実施の形態 2 における細胞外電位測定デバイスの製造方法は実施の形態 1 の製造方法とほぼ同じ工程を経て作製することができるが、異なる点は薄板 1 8 に貫通口 2 0 及び窪み 2 1 を形成する方法のみであり、この部分の製造方法について図面を用いて説明する。

【0069】

この工程は図 1 5 に示すように、中間層 1 7 と薄板 1 8 が積層された状態で薄板 1 8 側にレジストマスク 2 4 を形成した後貫通口 2 0 を形成するためにエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスによるドライエッチングを行い、所定の深さに達したときにエッチングを終了する。この所定の深さとは二酸化珪素からなる中間層 1 7 に達する前に止めることであり、窪み 2 1 の寸法形状に応じて最適な深さを適宜選択することができる。

20

【0070】

そして、このとき重要なことはエッチングの終了時にはエッチングを抑制するガスの供給を止めてエッチングを行った後に終了することである。

【0071】

又、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜（図示せず）を少しだけ形成する工程を繰り返すドライエッチングを行うときのエッチングの終了はエッチングを促進するガスによるドライエッチングの工程で終了することが重要である。これは、エッチングを抑制するガスによって形成される保護膜をエッチングの底面から除去するためである。

30

【0072】

次に、図 1 6 に示すように窪み 2 1 を形成するためのエッチングでは XeF_2 ガスを導入してドライエッチングを行うものである。

【0073】

この作業により、ドライエッチングはシリコンが露出している底面から進み、ウエル 1 9 側に進むに従って広がるようにエッチングが進む。

40

【0074】

この時、貫通口 2 0 の側壁には前の工程でエッチングを抑制するガスによって形成された保護膜（図示せず）が形成されているために XeF_2 によってドライエッチングされることはない。このようにして、窪み 2 1 は図 1 6 のように半球形をした形状に形成することができる。

【0075】

その後、実施の形態 1 と同じように図 9 ～図 1 3 の工程を経て細胞外電位測定デバイスを作製することができる。

【0076】

（実施の形態 3）

50

本発明の実施の形態 3 及び図 17～図 19 により請求項 5, 15 に記載の発明を説明する。図 17 は本発明の実施の形態 3 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図であり、図 18 及び図 19 はその要部拡大断面図である。

【0077】

本実施の形態 3 では実施の形態 1、実施の形態 2 で開示される貫通口 6, 20 と窪み 7, 21 を形成する別の製造方法について開示する。

【0078】

実施の形態 1 及び 2 で説明してきた製造法と異なる点は薄板 26 に貫通口 30 を形成する方法のみであるので、この部分の形成方法について図面を用いて説明する。

【0079】

図 17 は二酸化珪素よりなる中間層 25 とシリコンよりなる薄板 26 が積層された状態で薄板 26 側にレジストマスク 27 を形成した後、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスによる貫通口 30 を形成するためにドライエッチングを行った状態を示している。この状態において、エッチングは中間層 25 に達するまで過剰に行うことが特徴である。

【0080】

そして、このドライエッチングが中間層 25 に達した後もさらにエッチングを続ける。このときの中間層 25 は絶縁体であり、シリコンなどからなる薄板 26 はこの中間層 25 より絶縁抵抗が低い。このような構成で上記のようなエッチングを過剰に続けると、中間層 25 の面にはエッチングを促進するガスによるドライエッチングの際に、図 18 に示すようにエッチングイオン 28 (たとえば SF_5^+) が滞留するようになり、プラズマ中から供給されるエッチングイオン 29 は図 18 に示す矢印の方向にはじかれるようになる。

【0081】

その結果、このような構成においてドライエッチングを過剰に行うと中間層 25 の側壁近傍に集中的にドライエッチングが行われるようになり、図 19 に示すように貫通口 30 のウエル側が広がった窪み 31 を形成することができる。

【0082】

実験では直径 $3\ \mu\text{m}$ の貫通口 30 のドライエッチングを中間層 25 に達した後も過剰に行うことで、 $10\ \mu\text{m}$ の窪み 31 を形成することができた。

【0083】

【発明の効果】

以上のように本発明によれば、基板がベースとこのベースとは異なる材料による中間層とベースと同じ材料による薄板の積層構造からなり、ベース内にウエルと薄板内に貫通口が設けられ、この貫通口はウエル側の開口部の方が外方側より大きい窪みを有した細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的変化を測定するデバイスおよびこの製造方法を実現することによって、別途ウエルを設ける必要がなく、基板の中にウエル、貫通口が一体化形成されている極めてコンパクトな細胞外電位測定デバイスとすることができる。

【0084】

又、上記デバイスを製造する場合、2 種類のマスクをウエル側からフォトリソグラフィーを行う必要がなくなるとともにウエルを設けた基板のように凸凹がある場合においても凸凹面にも均一にレジストをコーティングするスプレーコーティング装置やフォトマスクと基板が非接触で高精度なパターンが露光できるプロジェクションやステッパなど高価な装置を必要とせず、極めて高精度な貫通口および窪みをウエル底面に設けられる製造方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの斜視図

【図 2】 (a) 同断面図 (b) 同要部拡大断面図

【図 3】 同細胞外電位測定デバイスの動作を示す断面図

【図 4】 同要部拡大断面図

【図 5】 同要部拡大断面図

10

20

30

40

50

【図 6】本発明の実施の形態 1 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための断面図

【図 7】同要部拡大断面図

【図 8】同要部拡大断面図

【図 9】同断面図

【図 10】同断面図

【図 11】同断面図

【図 12】同断面図

【図 13】同断面図

【図 14】本発明の実施の形態 2 における細胞外電位測定デバイスの断面図

10

【図 15】同細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための要部拡大断面図

【図 16】同要部拡大断面図

【図 17】本発明の実施の形態 3 における細胞外電位測定デバイスの製造方法を説明するための要部拡大断面図

【図 18】同要部拡大断面図

【図 19】同要部拡大断面図

【図 20】従来の細胞外電位測定デバイスの模式断面図

【符号の説明】

1 基板

2 ベース

20

3 中間層

4 薄板

5 ウエル

6 貫通口

7 窪み

8 検出電極

9 絶縁体

10 被験体細胞

11 培養液

12 レジストマスク

30

13 レジストマスク

15 基板

16 ベース

17 中間層

18 薄板

19 ウエル

20 貫通口

21 窪み

22 検出電極

23 絶縁体

40

24 レジストマスク

25 中間層

26 薄板

27 レジストマスク

28 エッチングイオン

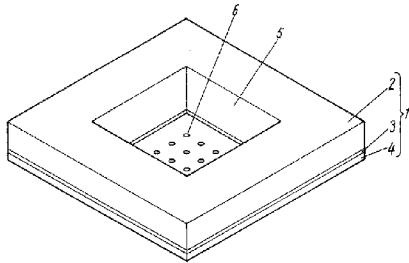
29 エッチングイオン

30 貫通口

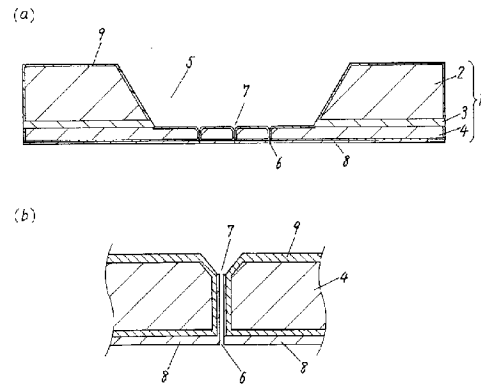
31 窪み

【図 1】

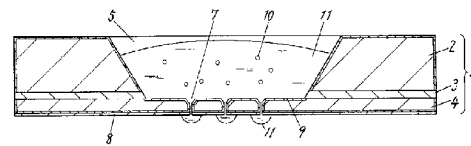
- 1 基板
2 ベース
3 中間層
4 薄板
5 ウエル
6 貫通口



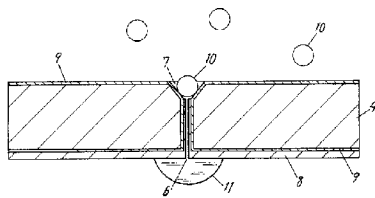
【図 2】



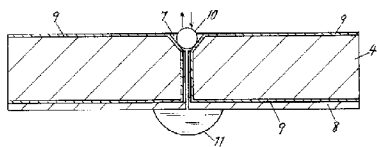
【図 3】



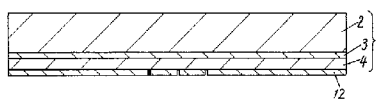
【図 4】



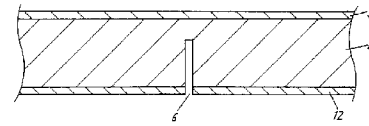
【図 5】



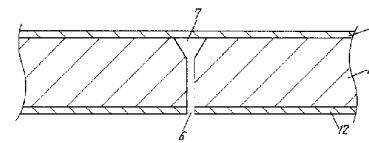
【図 6】



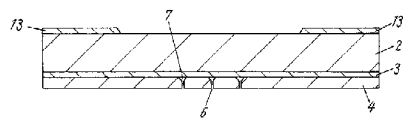
【図 7】



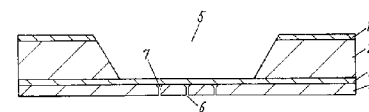
【図 8】



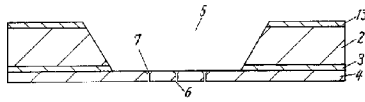
【図 9】



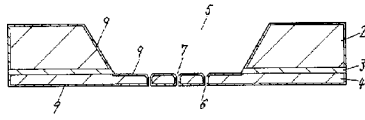
【図 10】



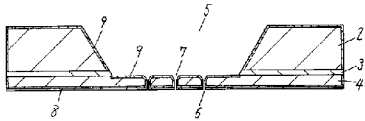
【図 1 1】



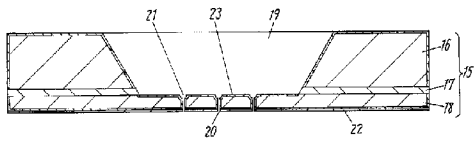
【図 1 2】



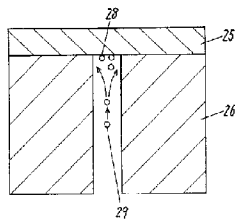
【図 1 3】



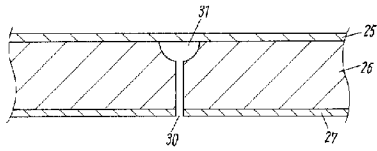
【図 1 4】



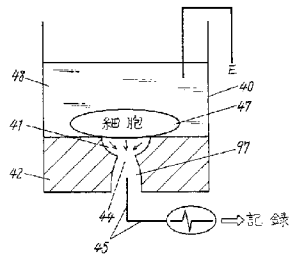
【図 1 8】



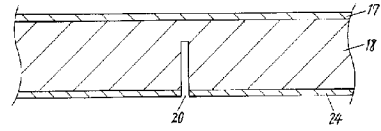
【図 1 9】



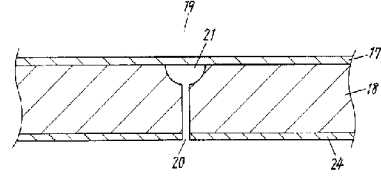
【図 2 0】



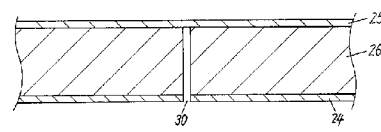
【図 1 5】



【図 1 6】



【図 1 7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z

(72)発明者 江本 文昭

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

F ターム(参考) 2G045 CB01 FB05 GC18 HA02

4B029 AA07 AA24 BB01 FA01